



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

EP 99 / 3291

REC'D 26 JUL 1999

WIPO PCT

09/07/99

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

98108726.5

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Der Präsident des Europäischen Patentamts:
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

D. DIEBER

DEN HAAG, DEN
THE HAGUE,
LA HAYE, LE

13/07/99



Europäisches
Patentamt

European
Patent Office

Office européen
des brevets

Blatt 2 der Bescheinigung
Sheet 2 of the certificate
Page 2 de l'attestation

Anmeldung Nr.
Application no.
Demande n°: 98108726.5

Anmeldetag
Date of filing
Date de dépôt: 13/05/98

Anmelder
Applicant(s)
Demandeur(s)
Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. Berlin
80539 München
GERMANY

Bezeichnung der Erfindung
Title of the invention
Titre de l'invention

Verfahren zur Erzeugung von Pflanzen mit erhöhter Toleranz gegen Trockenheit und/oder Pilzbefall
und/oder erhöhte Salzkonzentrationen durch die Expression plasmodesmen-lokalisierter Proteine

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s) revendiquée(s)

Staat
State
Pays

Tag
Date
Date

Aktenzeichen
File no.
Numéro de dépôt

Internationale Patentklassifikation
International Patent classification
Classification internationale des brevets

/

Am Anmeldetag benannte Vertragsstaaten
Contracting states designated at date of filing AT/BE/CH/CY/DE/DK/ES/FI/FR/GB/GR/IE/IT/LI/LU/MC/NU/PT/SE
Etats contractants désignés lors du dépôt

Bemerkungen
Remarks
Remarques

Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.
Berlin, Deutschland
U.Z.: B 2729 EP

**Verfahren zur Erzeugung von Pflanzen mit erhöhter Toleranz gegen
Trockenheit und/oder Pilzbefall und/oder erhöhte Salzkonzentrationen durch
die Expression plasmodesmen-lokalisierter Proteine**

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Nukleinsäuren, die ein (Poly)peptid mit einer intrinsischen Affinität zu Plasmodesmen kodieren, zur Erzeugung von Pflanzen oder Teilen davon mit erhöhter Toleranz gegen Trockenheit und/oder Pilzinfektionen und/oder erhöhten Salzkonzentrationen sowie entsprechende Verfahren. Vorteilhafterweise transfiziert man dabei eine Pflanze, ein Pflanzengewebe oder eine Pflanzenzelle mit der Nukleinsäure. Vorzugsweise kodiert die Nukleinsäure ein Virus-kodiertes Transportprotein, das in einer besonders bevorzugten Ausführungsform ein Derivat des pr17-Proteins mit einer hydrophilen N-terminalen Verlängerung ist.

Ein Ziel der klassischen Pflanzenzüchtung ist die Schaffung von ertragreichen Sorten, die eine erhöhte Toleranz gegenüber Umweltfaktoren aufweisen bzw. gegenüber Streßfaktoren resistent sind. Diese Streßfaktoren können sowohl biotischer (Insekten, Viren, Pilze etc.) als auch abiotischer Natur sein (extreme Temperaturen, Salz, Trockenheit). Während Wildpflanzen an streßdominierten Standorten sich an die extremen Lebensbedingungen adaptiert haben, beschränken Dürre, Hitze oder Salinität des Bodens die Möglichkeiten zum Anbau von Kulturpflanzen in solchen Gebieten. Andererseits erleidet die Landwirtschaft auch an anderen Standorten große Einbußen durch abiotischen Streß, wie das Beispiel des Dürrejahres 1983 in den USA gezeigt hat: Nahezu die Hälfte der gesamten Maisernte und ein Drittel des erwarteten Sojaertrags wurden durch die anhaltende Trockenheit vernichtet.

Allen genannten abiotischen Streßbedingungen ist gemein, daß sie das intrazelluläre Wassergleichgewicht stören. Pflanzen können sich jedoch in gewissen Grenzen auf Streßbedingungen einstellen (Bohnert, H.J., Nelson, D.E. und Jensen, R.G. (1995).

Adaptations to environmental stress. *Plant Cell* **7**: 1099-1011). So sind z.B. Proteine sowie Metaboliten des pflanzlichen Stoffwechsels wie Zuckeralkohole, Prolin oder Glyzinbetain als in der Folge von abiotischem Streß akkumulierende Osmoregulatoren identifiziert worden. Darauf basierend wurden verschiedene Strategien entwickelt, durch gentechnologische Veränderungen transgene Pflanzen mit erhöhter Toleranz gegenüber derartigen Faktoren bzw. erhöhter Streßresistenz zu erzeugen (Übersichtsartikel von Holmberg, N. und Bülow, L. (1998). Improving stress tolerance in plants by gene transfer. *Trends-Plant Science* **3**: 61-66). Ein Beispiel für pflanzliche Proteine als Antistress-Faktoren sind die sogenannten LEA (late embryogenesis abundant)-Proteine, deren erhöhte Expression mit physiologischem und Umweltstress korreliert und die eine Schutzfunktion für die Pflanze unter extremen Stressbedingungen darstellen (siehe z.B. Chandler, P.M. und Robertson, M. (1994). Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**: 113-141). Die gentechnische Veränderung von Reis mit Hilfe des Gersten-LEA-Gens HVA1 resultierte tatsächlich in einer erhöhten Toleranz gegenüber Trockenheit und Salz (Xu, D., Duan, X., Wang, B., Hong, B., Ho, T.-H.D. und Wu, R. (1996). Expression of a late embryogenesis abundant gene, HVA1 from barley, confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiology* **110**: 249-257). Andere Arbeiten zur Expression eines LEA-Gens in einem heterologen System konnten diese Befunde nicht unterstützen (Iturriaga, G., Schneider, K., Salamini, F. und Bartels, D. (1992). Expression of desiccation-related proteins from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* **20**: 555-558).

Unter den als Antistressfaktoren oder Osmoprotektoren identifizierten pflanzlichen Metaboliten befindet sich das Glyzinbetain, dessen Wirksamkeit z.B. im Mais nachgewiesen wurde (Saneoka, H., Nagasaka, C., Hahn, D.T., Yang, W.-J., Premachandra, G.S., Joly, R.J. und Rhodes, D. (1995). Salt tolerance of glycinebetaine-deficient and -containing maize lines. *Plant Physiol.* **107**: 631-638). An der Synthese des Glyzinbetains in pflanzlichen Chloroplasten ist die Betinaldehyd-Dehydrogenase (BADH) beteiligt (Rhodes, D. und Hanson, A.D.

(1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**: 357-384). Transgene Tabakpflanzen, welche eine bakterielle BADH (Holmstrom, K.-O., Welin, B., Mandal, A., Kristiansdottir, I., Teeri, T.H., Trond, L., Strom, A.R. und Palva, E.T. (1994). Production of the *Escherichia coli* betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine, in transgenic plants. *Plant. J.* **6**: 749-758) oder eine pflanzliche BADH exprimieren (Rathinasabapathi, B., McCue, K.F., Gage, D.A. und Hanson, A.D. (1994). Metabolic engineering of glycine betaine synthesis: plant betaine aldehyde dehydrogenase lacking typical transit peptides are targeted to tobacco chloroplasts where they confer betaine aldehyde resistance. *Planta* **193**: 155-162), zeigten die erwartete Resistenz gegen Betinaldehyd durch Konversion zu Glyzinbetain in Mengen, die in gestreßten Pflanzen gemessen werden. Über eine erhöhte Streßtoleranz dieser Pflanzen wurde jedoch nicht berichtet.

Zuckerderivate wie Zuckeralkohole oder Fruktane werden offensichtlich ebenfalls bei der Streßantwort der Pflanze in erhöhtem Maße gebildet und akkumuliert. Die Erhöhung des Mannitol-Spiegels in transgenen Tabakpflanzen durch Expression einer bakteriellen Mannitol-1-phosphate-Dehydrogenase bewirkte eine erhöhte Salztoleranz (Tarczynski, M.C., Jensen, R.G. und Bohnert, H.J. (1993). Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science* **259**: 508-510). Gleichmaßen zeigten transgene Tabakpflanzen mit erhöhtem Fruktangehalt im Vergleich mit Kontrollpflanzen eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegen Trockenheit (Pilon-Smith, E.A.H., Ebskamp, M.J.M., Paul, M.J., Jeuken, M.J.W., Weisbeek, P.J. und Smeekens, S.C.M. (1995). Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiol.* **107**: 125-130).

Allen diesen bisher genannten gentechnologischen Verfahren ist gemein, daß sie eine erhöhte Synthese von Osmoprotektoren in der Pflanze zur Folge haben, wodurch z.B. das normale Wachstum der Pflanze beeinträchtigt werden kann (siehe Rathinasabapathi et al., op. cit.). In anderen Fällen werden bakterielle Gene in der

Pflanze exprimiert, was nicht notwendigerweise mit einer optimalen Expression und damit einer suboptimalen Streßbewältigung einhergeht. Die der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende Aufgabe war somit, ein Verfahren bereitzustellen, Pflanzen mit gesteigerter Streßresistenz bereitzustellen, die dennoch ein im wesentlichen normales Wachstum aufweisen. Vorzugsweise sollte diese Streßresistenz (oder Toleranz) sich auf biotische wie auch abiotische Streßfaktoren beziehen. Diese Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen gelöst.

Die Erfindung betrifft somit die Verwendung einer Nukleinsäure, die ein (Poly)peptid mit einer intrinsischen Affinität zu Plasmodesmen kodiert zur Erzeugung von Pflanzen oder Teilen davon mit erhöhter Toleranz gegen Trockenheit und/oder Pilzinfektionen und/oder erhöhten Salzkonzentrationen. Üblicherweise wird erfindungsgemäß eine Pflanze, ein Pflanzengewebe oder eine Pflanzenzelle mit einer derartigen Nukleinsäure nach konventionellen Verfahren transfiziert.

Alle höheren Pflanzen zeichnen sich dadurch aus, daß sie zur Photosynthese von Zuckern und deren Derivaten befähigt sind, die wie oben erwähnt als Osmoprotektoren unter Streßbedingungen dienen können. Die intrazelluläre Konzentration der Zucker und Zuckerderivate - vor allem in den Blättern zum Schutz der Photosynthese-aktiven Chloroplasten - wurde erfindungsgemäß in überraschend einfacher Weise durch die vorstehend gekennzeichnete Maßnahme gelöst. Von besonderem Vorteil neben der Tatsache, daß diese Maßnahme für den Fachmann in einfacher Weise zu bewerkstelligen ist, ist ferner, daß erfindungsgemäß die Streßresistenz mit einem in vielen und möglicherweise sogar allen Pflanzen gültigen

Mechanismus erhöht werden kann. Überraschenderweise konnte mit dem erfindungsgemäßen Verfahren die pflanzliche Toleranz sowohl gegenüber abiotischen wie auch gegenüber biotischen Faktoren erhöht werden.

Der Begriff "erhöhte Salzkonzentration" bezieht sich auf Salzkonzentrationen im Boden, die zu einer erhöhten Ionenkonzentration in der Pflanze führen, die dann zu vermindertem Wachstum führt. Die absoluten Salzkonzentrationen im Boden, die als erhöht anzusehen sind, sind für unterschiedliche Pflanzen verschieden, können vom

Fachmann aber nach konventionellen Verfahren bestimmt werden, z.B. anhand des Offenbarungsgehaltes von Greenway und Munns (1980). Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **31**: 149-190.

In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung wird ferner eine Pflanze aus der transfizierten Pflanzenzelle regeneriert.

Die Regeneration der Pflanzen kann nach üblichen und dem Fachmann geläufigen Verfahren erfolgen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung werden im Anschluß an den Regenerationsschritt ferner weitere Pflanzen oder Pflanzenzellen aus der regenerierten Pflanze erzeugt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung ist das (Poly)peptid ein Virus-kodiertes Transportprotein.

Die Expression von pflanzenviralen Proteinen, die am Transport viraler Information von Zelle zu Zelle beteiligt sind (Transportproteine), beeinflussen auch den Transport bzw. Metabolismus von Stärke, Zuckern und Zuckerderivaten derart, daß sie während der Lichtperiode in den Photosynthese-aktiven Blättern der Pflanze zu höheren als normalen Werten akkumulieren (vgl. z.B. Lucas u.a. (1993). Influence of the tobacco mosaic virus 30-kDa movement protein on carbon metabolism and photosynthate partitioning in transgenic tobacco plants. *Planta* **190**: 88-96; Olesinski u.a. (1995). Pleiotropic effects of tobacco-mosaic-virus movement protein on carbon metabolism in transgenic tobacco plants. *Planta* **197**: 118-126; Olesinski u.a.

(1996). Tissue-specific expression of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic potato plants alters plasmodesmal function and carbohydrate partitioning. *Plant Physiol.* **111**: 541-550; Herbers u.a. (1997). Expression of a luteoviral movement protein in transgenic plants leads to carbohydrate accumulation and reduced photosynthetic capacity in source leaves. *Plant J.* **12**: 1045-1056; Almon u.a. (1997). Phloem-specific expression of the tobacco mosaic virus movement protein alters carbon metabolism and partitioning in transgenic potato plants. *Plant Physiol.* **115**: 1599-1607). Die Erhöhung der pflanzlichen Toleranz gegenüber den

vorstehend genannten Umweltfaktoren durch die Expression derartiger Proteine mit einer intrinsischen Affinität zu Plasmodesmen, den Verbindungskanälen benachbarter Zellen in Pflanzen gemäß dieser bevorzugten Ausführungsform der Erfindung war aus dem Stand der Technik nicht ohne weiteres abzuleiten. Die eigentliche Funktion von virus-kodierten Transportproteinen (TP) besteht nämlich darin, den Transport der genetischen Information eines Virus von Zelle zu Zelle zu gewährleisten und so die Ausbreitung eines Virus vom ursprünglichen Infektionsort in die gesamte Pflanze zu ermöglichen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung ist das Virus-kodierte Transportprotein das Kartoffelblattrollvirus-(PLRV) Transportprotein pr17 oder ein Derivat davon.

Wie in den Beispielen erläutert wurden das TP des Kartoffel-Blattrollvirus (potato leafroll virus, PLRV) sowie die Kulturpflanze Kartoffel als Modellsystem gewählt. Das PLRV-TP, das ein Merkmal einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens darstellt, ist ein 17 kDa großes Protein (pr17), das für den Transfer der genomischen RNA von Zelle zu Zelle verantwortlich ist. Es wird durch das offene Leseraster (ORF) ORF4 kodiert; dieses Gen ist innerhalb des ORF3, des Gens für das virale Kapsidprotein CP, gelegen, jedoch in einem anderen Leseraster. Das Protein besitzt eine aminoterminal Domäne zur Bildung von Homopolymeren (Tacke, E., Prüfer, D., Schmitz, J. und Rohde, W. (1993). Mutational analysis of the nucleic acid-binding 17K protein of potato leafroll luteovirus identifies an amphipathic α -helix as the domain for protein/protein interactions. *Virology* **197**: 274-282.) und eine carboxyterminale Domäne zur Bindung einzelsträngiger Nukleinsäuren (Tacke, E., Prüfer, D., Schmitz, J. and Rohde, W. (1991): The potato leafroll luteovirus 17 kDa protein is a single-stranded nucleic acid-binding protein. *J. Gen. Virol.* **72**: 2035-2038). Dieses Protein, das *in planta* phosphoryliert vorliegt (Tacke *et al.*, 1993, op. cit.; Sokolova, M., Prüfer, D., Tacke, E. und Rohde, W. (1997). The potato leafroll virus 17K movement protein is phosphorylated by a membrane-associated protein kinase from potato with biochemical features of protein kinase C. *FEBS Lett.* **400**: 201-205), wird siebenfach stärker exprimiert als das virale Hüllproteingen (Tacke, E., Prüfer, D., F. Salamini

und Rohde, W. (1990). Characterization of a potato leafroll luteovirus subgenomic RNA: Differential expression of viral proteins by internal translation initiation and UAG suppression. *J. Gen. Virol.* **71**: 2265-2272). In PLRV-infizierten sowie in pr17-transgenen Kartoffelpflanzen ist das pr17 vorwiegend an den Plasmodesmen zwischen Siebelement und Geleitzelle des Phloems lokalisiert (Schmitz, J., Stussi-Garaud, C., Tacke, E., Prüfer, D., Rohde, W. und Rohfritsch, O. (1997). *In situ* localization of the putative movement protein (pr17) from potato leafroll luteovirus (PLRV) in infected and transgenic potato plants. *Virology* **235**: 311-322), auf das sich das Virus während seiner Vermehrung in der Pflanze beschränkt. Expression eines mutierten pr17-Proteins in transgenen Kartoffelpflanzen bewirkt Breitbandresistenz gegen die wichtigsten Kartoffelviren (Tacke, E., Salamini, F. und Rohde, W. (1996). Genetic engineering of potato for broad-spectrum protection against virus infection. *Nature Biotechnology* **14**: 1597-1601). Zugleich wurde jedoch im Zuge dieser Erfindung beobachtet, daß die Expression von WT und mutierten PLRV-TPs in transgenen Kartoffel- und Tabakpflanzen zu einem Anstieg der intrazellulären Konzentrationen von Zuckern (Sucrose, Fruktose, Glucose) und Zuckerderivaten wie Stärke führt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung ist das Derivat ein pr17-Protein mit einer hydrophilen N-terminalen Verlängerung.

Besonders gute Ergebnisse im Sinne dieser Erfindung wurden gefunden, wenn eine Variante des pr17-Gens verwendet wurde, die eine N-terminale Verlängerung trägt (pr17-N). In einem Ausführungsbeispiel wurde zum 5'-Ende des pr17-WT-Gens der Polylinker (multiple cloning site; MCS) des Bluescript-Vektors translational fusioniert und durch gezielte Mutagenese sowohl die beiden ersten AUG-Translationskodons von pr17 in ACG-Kodons mutiert und ein AUG-Translationsstartkodon in die Polylinkersequenz eingeführt (Figur 1). Diese Veränderung resultiert in der Expression eines Derivates (pr17-N) des pr17-WT-Proteins mit einer hydrophilen Verlängerung durch die Sequenz MAELGSGSELHRGGGRSRTS am Aminoterminal (Tacke u.a., 1996, op. cit.; Figur 2). Solche transgenen Kartoffelpflanzen zeigen im

Gewächshaus-Test Breitbandresistenz gegen die Kartoffelviren PLRV, PVY und PVX sowie eine erhöhte Konzentration an Zuckern und Zuckerderivaten.

Zur Expression in Pflanzen wurde dieses Gen unter die transkriptionelle Kontrolle des 35S-Promotors und -Terminators des Blumenkohlmosaikvirus (CaMV) im Vektor pRT103 gebracht (Töpfer u.a. (1987). A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Res.* **15**: 5890) und diese Transkriptionseinheit (Figur 1) anschließend in den binären Pflanzen-transformationsvektor pBIN19 integriert (Bevan, M. (1984). Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* **12**: 8711-8721). Dieser Vektor wurde in den *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm LBA4404 (pAL4404) übertragen (Hoekema u.a. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* **303**: 179-180), der zur Transformation von *Solanum tuberosum* Var. Linda eingesetzt wurde. Vier (L4, L6, L7 und L8; siehe auch Tacke *et al.*, 1996, op. cit.) der unabhängigen transgenen Kartoffellinien sowie die Ausgangskartoffelsorte Linda wurden für die weiteren Versuche zur induzierten Toleranz ausgewählt.

Wie bereits vorstehend erwähnt, umfaßt in einer besonders bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung die hydrophile Verlängerung die Aminosäuresequenz MAELGSGSELHRGGGRSRTS.

In einer anderen Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung stammen die Pflanze, das Pflanzengewebe oder die Pflanzenzellen aus der Kartoffel, aus Tabak, aus Getreide oder Gemüse bzw. sind Kartoffeln, Tabakpflanzen, Getreidepflanzen oder Gemüsepflanzen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verwendung ist die Erhöhung der Toleranz der Pflanzen gegen Pilzinfektionen eine der Toleranz gegen Infektionen mit *Phytophthora infestans*.

Als ein überraschender Befund gemäß dieser bevorzugten Ausführungsform wurde gefunden, daß mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erhaltene transgene Linien

sich auch durch eine statistisch signifikante Toleranz gegen *Phytophthora infestans*, den Erreger der Kraut- und Knollenfäule, auszeichnen.

Die Erfindung betrifft ferner Verfahren zur Erzeugung von Pflanzen oder Teilen davon mit erhöhter Toleranz gegen Trockenheit und/oder Pilzinfektionen und/oder erhöhte Salzkonzentrationen, wobei man

- (a) eine Pflanze, ein Pflanzengewebe oder eine Pflanzenzelle mit einer Nukleinsäure transfiziert, die ein (Poly)peptid mit einer intrinsischen Affinität zu Plasmodesmen kodiert.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird ferner

- (b) eine Pflanze aus der transfizierten Pflanzenzelle regeneriert.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erzeugt man

- (c) im Anschluß an Schritt (b), ferner weitere Pflanzen oder Pflanzenzellen aus der in (b) gewonnenen Pflanze.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das (Poly)peptid ein Virus-kodiertes Transportprotein.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das Virus-kodierte Transportprotein das Kartoffelblattrollvirus-(PLRV)

Transportprotein pr17 oder ein Derivat davon.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das Derivat ein pr17-Protein mit einer hydrophilen N-terminalen Verlängerung.

Wie bereits vorstehend erwähnt, umfaßt in einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens die hydrophile Verlängerung die Aminosäuresequenz MAELGSGSELHRGGGRSRTS.

In einer anderen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens stammen die Pflanze, das Pflanzengewebe oder die Pflanzenzellen aus der Kartoffel, aus Tabak, aus Getreide oder Gemüse bzw. sind Kartoffeln, Tabakpflanzen, Getreidepflanzen bzw. Gemüsepflanzen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Erhöhung der Toleranz der Pflanzen gegen Pilzinfektionen eine der Toleranz gegen Infektionen mit *Phytophthora infestans*.

Die Figuren zeigen:

Figur 1

Herstellung des Plasmids p17N. Durch spezifische Mutagenese wurden die beiden AUG-Kodons des Wildtyp pr17-Gens in ACG mutiert und ein Translations-Initiationskodon in die Polylinkersequenz eingeführt.

Figur 2

Nukleotid und Aminosäuresequenz des mutierten pr17N-Gens bzw. -Proteins.

Figur 3

Ergebnis des Resistenztests #1 (im Gewächshaus) mit je 5 Pflanzen der Ausgangssorte Linda (L) sowie der pr17N-transgenen Linien L4, L6, L7 und L8.

A. Gesamtansicht des Versuchs. B. Ansicht je einer Pflanze pro Linie.

Figur 4

Ergebnis des Resistenztests #2 (in der Phytokammer) mit je 6 Pflanzen der Ausgangssorte Linda (L) sowie der pr17N-transgenen Linien L4, L6, L7 und L8.

A. Teilansicht des Gesamtversuchs. B. Ansicht ausgewählter Pflanzen

Figur 5

Bonitur des Befalls von Blattscheiben im Labortest mit *P. infestans* Rasse 1-11 (Versuch #2) nach 9, 10 und 13 Tagen nach der Infektion (dpi).

Figur 6

Kumulative Darstellung zweier Versuche der Infektion von Kartoffel-Blattscheiben mit *P. infestans* Rasse 1-11.

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1: Herstellung des Plasmids p17N

Eine Modifikation am 5'-Ende des pr17-Gens (ORF4) wurde durch translationale Fusion der multiple cloning site des Bluescript-Vektors, Einführung eines optimierten Translationsinitiationskodons sowie Mutation der beiden pr17-WT AUG-Initiationskodons zu ACG erreicht (Figur 1). Diese Veränderung resultiert in der Expression eines Derivates (pr17-N) des pr17-WT-Proteins mit einer hydrophilen Verlängerung durch die Sequenz MAELGSGSELHRGGGRSRTS am Aminoterminus (Tacke *et al.*, 1996, op. cit.; Figur 2). Die Herstellung des Plasmids p17N ist beschrieben in Schmitz, J., Prüfer, D., Rohde, W. und Tacke, E. (1996). Non-canonical translation mechanisms in plants: Efficient *in vitro* and *in planta* initiation at AUU codons of the tobacco mosaic virus enhancer sequence. *Nucleic Acids Res.* 24: 257-263 (dort bezeichnet als p17/NIII).

Beispiel 2: Einführung der T-DNA in den Empfängerorganismus

Nach Transformation von *E. coli* S17-1 Zellen und Mating mit dem *A. tumefaciens* Stamm LBA 4404 (pAL 4404) (Hoekema *et al.*, 1983) wurden Agrobakterien, die das Plasmid p17N trugen, zur Pflanzentransformation eingesetzt. Blätter von *S. tuberosum* var. Linda aus der Sterilkultur wurden an der Basis abgeschnitten und 10 min in flüssigem MS-Medium mit einer über Nacht gewachsenen Agrobakterien-Kultur inkubiert. Nach zweitägiger Inkubation auf festem MS-Medium wurden die

Blätter abgewaschen und auf Selektions-, Regenerationsmedium ausgelegt. Dieses bestand aus MS-Medium komplementiert mit 0,02 mg/l Naphtylelessigsäure, 0,02 mg/l Giberellinsäure, 2 mg/l Zeatinribosid, 500 mg/l Claforan und 100 mg/l Kanamycinsulfat. Sprosse bildeten sich nach 6-8 Wochen und wurden zur Wurzelbildung auf MS-Medium mit 250 mg/l Claforan und 150 mg/l Kanamycinsulfat umgesetzt.

Beispiel 3: Charakterisierung der erhaltenen transgenen Linien

Die Expression des N-terminal modifizierten PLRV 17K TP wurde im Western blot mit Hilfe 17K-spezifischer Antiseren nachgewiesen wie in Tacke u.a., 1996 (op. cit.) beschrieben. Dazu wurden Proteinextrakte aus Blattmaterial hergestellt, die Proteine auf einem 12.5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, auf Nitrozellulose-Membranen überführt und mit einem 17K-spezifischen Antikörper inkubiert. Der Nachweis gebundener Antikörper geschah nach bewährten Verfahren durch Inkubation mit Schaf-Anti-Kaninchen-IgG/Peroxidasekonjugat und dem Peroxidasesubstrat des ECL-Kits (Amersham).

Beispiel 4: Resistenztests mit *Phytophthora infestans*

Zur Ermittlung der quantitativen Resistenz wurden im Labor Befallstests mit dem Erreger der Kraut- und Knollenfäule, *Phytophthora infestans*, durchgeführt. Als Inokulum wurde die Rasse 1-11 des Pathogens verwendet (diese Rasse wird zur Erhaltung auf Blattmaterial der Kartoffelsorte Désirée kultiviert). Dazu wurden

Kartoffelblättchen in einer Bewässerungsbox (Gieffers, W., V.H. Paul und E. Ritter, 1989, Der Einfluß von Sauerstoff und UV-Licht auf die Konidienproduktion von *Pseudocercospora herpotrichoides* (Fron) Deighton, Merkmale zur Morphologie und dessen Nachweis an Dikotyledonen. J. Phytopathology **126**: 115-132), die eine permanente Wasserversorgung ermöglicht, mit dem Erreger inokuliert und unter 10°C ausgelegt. Die Lichtversorgung erfolgte mit 10 Röhren des Typs Osram, L16, W/25 Weiß Universal für 16 h täglich mit einer mittleren photoperiodisch aktiven Strahlung von ca. 100 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$. Die nach 8-10 Tagen gebildeten Sporangien

wurden von den Blättchen mit Wasser abgespült. Der Anteil lebender Sporangien wurde mit der Färbemethode nach Behr (Behr, L., 1955: Eine neue Methode der Plasmafärbung von Pilzsporen mit Haematoxylin. Zentralblatt für Bakt. Etc. II 108: 23/24, 641-656) ermittelt. Für Befallstests wurde eine Suspension mit einer Sporangien-dichte von 10^4 ml^{-1} verwendet.

In Anlehnung an den Test nach Hodgson (Hodgson, W.A. (1961). Laboratory testing of the potato for resistance to *Phytophthora infestans*. American Potato Journal 38: 259-264) wurde ein neues Prüfverfahren entwickelt. Mittels einer für den Test entwickelten Stanze werden Blattscheiben von 20 mm Durchmesser hergestellt. Das Stanzverfahren arbeitet druckarm, so daß die Blattränder nicht gequetscht und Nekrosen sowie bakterielle Fäulen vermieden werden.

Die Blattscheiben werden in Bewässerungsboxen (Gieffers et al., op. cit.) auf Filterpapier mit der Unterseite nach oben ausgelegt. Der ständige Wasserfilm auf dem Filterpapier versorgt die Blattscheiben ausreichend mit Wasser. Zur Inokulation wird ein Tropfen mit einer Sporangien-suspension (200 Sporangien/20µl) auf die Blattscheibenmitte pipettiert.

Die inokulierten Blattscheiben werden unter einer Dauertemperatur von 10°C und den o.g. Lichtbedingungen inkubiert. Unter diesen Bedingungen schlüpfen die infektiösen Zoosporen. Nach ca. 6 Tagen werden die ersten Sporangien gebildet, die Befallsbonitur erfolgt nach 8 bis 10 Tagen.

Der Blattscheibenbefall, sichtbar durch Sporangienrasenbildung und Blattgewebezerfall, wird prozentual eingeschätzt.

Eine wichtige Voraussetzung für den Test besteht darin, daß die zu prüfenden Kartoffelpflanzen unter gleichen Bedingungen kultiviert und die Blattscheiben von Blättchen gleicher Blatttagen und gleicher Blattstellung gewonnen werden.

Auf diese Weise kann der quantitative Befall von Gewächshaus- wie Freilandmaterial geprüft werden. Die Befallshöhe entscheidet über den quantitativen Resistenzgrad.

Beispiel 5: Induzierte Toleranz gegen Trockenheit als Beispiel für erhöhte Toleranz gegen abiotischen Stress

Jeweils 5 bzw. 6 Pflanzen der transgenen Linien L4, L6, L7 und L8 sowie die Ausgangssorte Linda wurden im 6-8Blatt-Stadium für 8 Wochen unter Trockenstress gehalten, wobei nach 3 und nach 6 Wochen die Pflanzen je einmal gewässert wurden. Die transgenen Pflanzen zeigten dabei in zwei unabhängigen Experimenten eine deutlich erhöhte Toleranz gegen Wasserstress, wie aus Tabelle 1 und den Figuren 3 und 4 hervorgeht.

Tabelle 1: Auswertung der Kartoffellinien L4, L6, L7 und L8 sowie der Ausgangssorte Linda nach 8 Wochen Wasserstress

Linie / Sorte # überlebende Pflanzen / # der untersuchten Pflanzen

	Exp. 1**	Exp. 2***
Linda	1*/5	1*/6
L4	4/5	6/6
L6	5/5	6/6
L7	5/5	6/6
L8	5/5	5/6

* die überlebende Pflanze entwickelt aus der Knolle einen neuen Sproß; alle ursprünglichen Pflanzenteile sind tot im Gegensatz zu den überlebenden Pflanzen der transgenen Linien L4, L6, L7 und L8.

** Dieser Versuch wurde unter kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus durchgeführt.

*** Dieser Versuch wurde unter kontrollierten Bedingungen in einer Phytokammer durchgeführt.

Beispiel 6: Induzierte Toleranz gegen *Phytophthora infestans* als Beispiel für erhöhte Toleranz gegen Pilzbefall

Zwei unabhängige Befallsversuche mit *P. infestans* wurden mit den Rassen 1-11 auf Blattscheiben von Gewächshausmaterial durchgeführt. Dabei wurden von 8 Pflanzen pro transgene Linie und Ausgangssorte Linda je 8 Blattscheiben zur Infektion im Labortest verwendet. Das Inokulum enthielt 200 Sporangien pro 20 µl Wasser; die Inkubation der Blattscheiben erfolgte bei 10°C und Bonituren wurden nach 9, 10 und 13 Tagen nach der Infektion (dpi) vorgenommen. Alle 4 transgenen Linien zeigten gegenüber *P. infestans* bis 10 dpi signifikant geringeren Befall. Danach nahm der Befall bei L7 und L8 schnell zu, während L6 und besonders L4 weiterhin ihr relativ geringeres Befallsniveau beibehielten (Figur 5). Im Mittel beider Versuche ergibt sich ein signifikanter Unterschied im Resistenzverhalten der 4 getesteten transgenen Lindalinien im Vergleich zur nichttransgenen Ausgangssorte Linda (Figur 6).

PATENTANSPRÜCHE

1. Verwendung einer Nukleinsäure, die ein (Poly)peptid mit einer intrinsischen Affinität zu Plasmodesmen kodiert, zur Erzeugung von Pflanzen oder Teilen davon mit erhöhter Toleranz gegen Trockenheit und/oder Pilzinfektionen und/oder erhöhte Salzkonzentrationen.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei ferner eine Pflanze aus der transfizierten Pflanzenzelle regeneriert wird.
3. Verwendung nach Anspruch 2, wobei, im Anschluß an die Regeneration, ferner weitere Pflanzen oder Pflanzenzellen aus der regenerierten Pflanze erzeugt werden.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das (Poly)peptid ein Virus-kodiertes Transportprotein ist.
5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei das Virus-kodierte Transportprotein das Kartoffelblattrollvirus-(PLRV) Transportprotein pr17 oder ein Derivat davon ist.
6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei das Derivat ein pr17-Protein mit einer hydrophilen N-terminalen Verlängerung ist.
7. Verwendung nach Anspruch 6, wobei die hydrophile Verlängerung die Aminosäure MAELSGSGSELHRGGGRSRTS ist.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Pflanze, das Pflanzengewebe oder die Pflanzenzellen aus der Kartoffel, aus Tabak, aus Getreide oder Gemüse stammen bzw. Kartoffeln, Tabakpflanzen, Getreidepflanzen bzw. Gemüsepflanzen sind.

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Erhöhung der Toleranz von Pflanzen gegen Pilzinfektionen eine Erhöhung der Toleranz gegen Infektionen mit *Phytophthora infestans* ist.
10. Verfahren zur Erzeugung von Pflanzen oder Teilen davon mit erhöhter Toleranz gegen Trockenheit und/oder Pilzinfektionen und/oder erhöhte Salzkonzentrationen, wobei man
 - (a) eine Pflanze, ein Pflanzengewebe oder eine Pflanzenzelle mit einer Nukleinsäure transfiziert, die ein (Poly)peptid mit einer intrinsischen Affinität zu Plasmodesmen kodiert.
11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei man ferner
 - (b) eine Pflanze aus der transfizierten Pflanzenzelle regeneriert.
12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei man, im Anschluß an Schritt (b) ferner
 - (c) weitere Pflanzen oder Pflanzenzellen aus der in (b) gewonnenen Pflanze erzeugt.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, wobei das (Poly)peptid ein Virus-kodiertes Transportprotein ist.
14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei das Virus-kodierte Transportprotein das Kartoffelblattrollvirus-(PLRV) Transportprotein pr17 oder ein Derivat davon ist.
15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei das Derivat ein pr17-Protein mit einer hydrophilen N-terminalen Verlängerung ist.
16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die hydrophile Verlängerung die Aminosäure MAELSGSGSELHRGGGRSRTS ist.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 16, wobei die Pflanze, das Pflanzengewebe oder die Pflanzenzellen aus der Kartoffel, aus Tabak, aus

Getreide oder Gemüse stammen bzw. Kartoffeln, Tabakpflanzen, Getreidepflanzen oder Gemüsepflanzen sind.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 17, wobei die Erhöhung der Toleranz von Pflanzen gegen Pilzinfektionen eine Erhöhung der Toleranz gegen Infektionen mit *Phytophthora infestans* ist.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Nukleinsäuren, die ein (Poly)peptid mit einer intrinsischen Affinität zu Plasmodesmen kodieren, zur Erzeugung von Pflanzen oder Teilen davon mit erhöhter Toleranz gegen Trockenheit und/oder Pilzinfektionen und/oder erhöhten Salzkonzentrationen sowie entsprechende Verfahren. Vorteilhafterweise transfiziert man dabei eine Pflanze, ein Pflanzengewebe oder eine Pflanzenzelle mit der Nukleinsäure. Vorzugsweise kodiert die Nukleinsäure ein Virus-kodiertes Transportprotein, das in einer besonders bevorzugten Ausführungsform ein Derivat des pr17-Proteins mit einer hydrophilen N-terminalen Verlängerung ist.



1050

SECRET

AACAAATGGCAGAGCTCGGATCCGGATCCGAGCTCCACCGGGTGGCGCTCTAGACT
 N A E L S S E L H R G G R S R T

W A E L G S E S E L H R E G R S R T

AGTACG CACGGTGGTGTACACACACCAAGGAGGGGAGGCAATCCCTTCGAGCGG

1 S T U V W X Y Z 1 S T U V W X Y Z 1 S T U V W X Y Z

CGCTAACAGAGTTCAGCCAGTGGTTATGGTCACGGCCTCTGGCAACCCAGGCGCGAAGA
L T E F S R N L N S R P L S N F S A E O

LETTERS AND NUMBERS

CGTAGAGAGGAGGCATCGCCGCTCAGAGAGAACTGGAGTTCGCCGAGGACGAGGCTCAA
U E E E A A A A A E E L E F P E D E A Q

U E E A I A A A E L E F E D E R D

GCAGACATTCGTTTACAAAGGACACCTCATGGGCACTCCCAAGGAGTTTCACTT
 AAAASCTZLQQRFTSMHAPKEVSP

[illegible]

CGGGGCGAGTGTATCAGACTGTCCGGCATTCAGAGGATGGATATTCAGGGCTACCGATGAG

1
 2
 3
 4
 5
 6
 7
 8
 9
 10
 11
 12
 13
 14
 15
 16
 17
 18
 19
 20
 21
 22
 23
 24
 25
 26
 27
 28
 29
 30
 31
 32
 33
 34
 35
 36
 37
 38
 39
 40
 41
 42
 43
 44
 45
 46
 47
 48
 49
 50
 51
 52
 53
 54
 55
 56
 57
 58
 59
 60
 61
 62
 63
 64
 65
 66
 67
 68
 69
 70
 71
 72
 73
 74
 75
 76
 77
 78
 79
 80
 81
 82
 83
 84
 85
 86
 87
 88
 89
 90
 91
 92
 93
 94
 95
 96
 97
 98
 99
 100
 101
 102
 103
 104
 105
 106
 107
 108
 109
 110
 111
 112
 113
 114
 115
 116
 117
 118
 119
 120
 121
 122
 123
 124
 125
 126
 127
 128
 129
 130
 131
 132
 133
 134
 135
 136
 137
 138
 139
 140
 141
 142
 143
 144
 145
 146
 147
 148
 149
 150
 151
 152
 153
 154
 155
 156
 157
 158
 159
 160
 161
 162
 163
 164
 165
 166
 167
 168
 169
 170
 171
 172
 173
 174
 175
 176
 177
 178
 179
 180
 181
 182
 183
 184
 185
 186
 187
 188
 189
 190
 191
 192
 193
 194
 195
 196
 197
 198
 199
 200
 201
 202
 203
 204
 205
 206
 207
 208
 209
 210
 211
 212
 213
 214
 215
 216
 217
 218
 219
 220
 221
 222
 223
 224
 225
 226
 227
 228
 229
 230
 231
 232
 233
 234
 235
 236
 237
 238
 239
 240
 241
 242
 243
 244
 245
 246
 247
 248
 249
 250
 251
 252
 253
 254
 255
 256
 257
 258
 259
 260
 261
 262
 263
 264
 265
 266
 267
 268
 269
 270
 271
 272
 273
 274
 275
 276
 277
 278
 279
 280
 281
 282
 283
 284
 285
 286
 287
 288
 289
 290
 291
 292
 293
 294
 295
 296
 297
 298
 299
 300
 301
 302
 303
 304
 305
 306
 307
 308
 309
 310
 311
 312
 313
 314
 315
 316
 317
 318
 319
 320
 321
 322
 323
 324
 325
 326
 327
 328
 329
 330
 331
 332
 333
 334
 335
 336
 337
 338
 339
 340
 341
 342
 343
 344
 345
 346
 347
 348
 349
 350
 351
 352
 353
 354
 355
 356
 357
 358
 359
 360
 361
 362
 363
 364
 365
 366
 367
 368
 369
 370
 371
 372
 373
 374
 375
 376
 377
 378
 379
 380
 381
 382
 383
 384
 385
 386
 387
 388
 389
 390
 391
 392
 393
 394
 395
 396
 397
 398
 399
 400
 401
 402
 403
 404
 405
 406
 407
 408
 409
 410
 411
 412
 413
 414
 415
 416
 417
 418
 419
 420
 421
 422
 423
 424
 425
 426
 427
 428
 429
 430
 431
 432
 433
 434
 435
 436
 437
 438
 439
 440
 441
 442
 443
 444
 445
 446
 447
 448
 449
 450
 451
 452
 453
 454
 455
 456
 457
 458
 459
 460
 461
 462
 463
 464
 465
 466
 467
 468
 469
 470
 471
 472
 473
 474
 475
 476
 477
 478
 479
 480
 481
 482
 483
 484
 485
 486
 487
 488
 489
 490
 491
 492
 493
 494
 495
 496
 497
 498
 499
 500
 501
 502
 503
 504
 505
 506
 507
 508
 509
 510
 511
 512
 513
 514
 515
 516
 517
 518
 519
 520
 521
 522
 523
 524
 525

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000 1001 1002 1003 1004 1005 1006 1007 1008 1009 1010 1011 1012 1013 1014 1015 1016 1017 1018 1019 1020 1021 1022 1023 1024 1025 1026 1027 1028 1029 1030 1031 1032 1033 1034 1035 1036 1037 1038 1039 1040 1

CCATCCTTATGACTTGGACCCDCHTTGCAAGGATCATCTCTGACTCTACCTGACAAA

[illegible]

GTTCGAATTACGAAAGGCGGGCGAAGATTTATAGGCGCGGATGTAAGGAGCC

5

Fig. 2

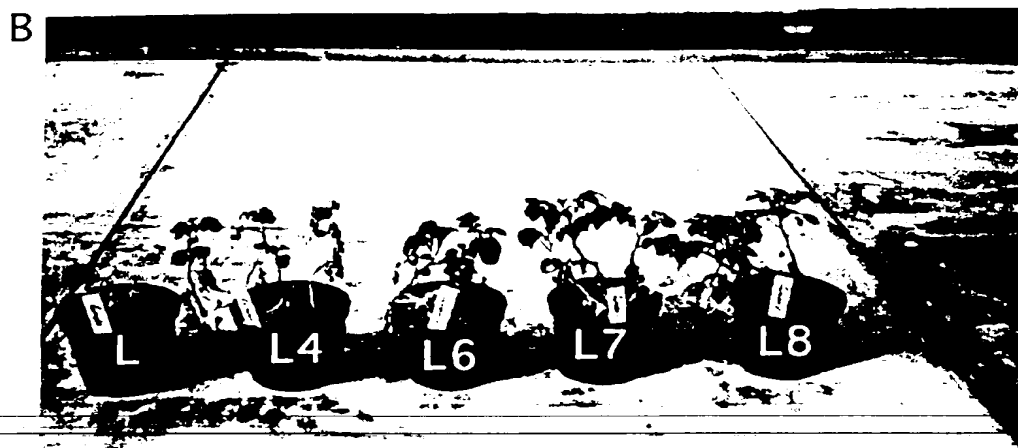
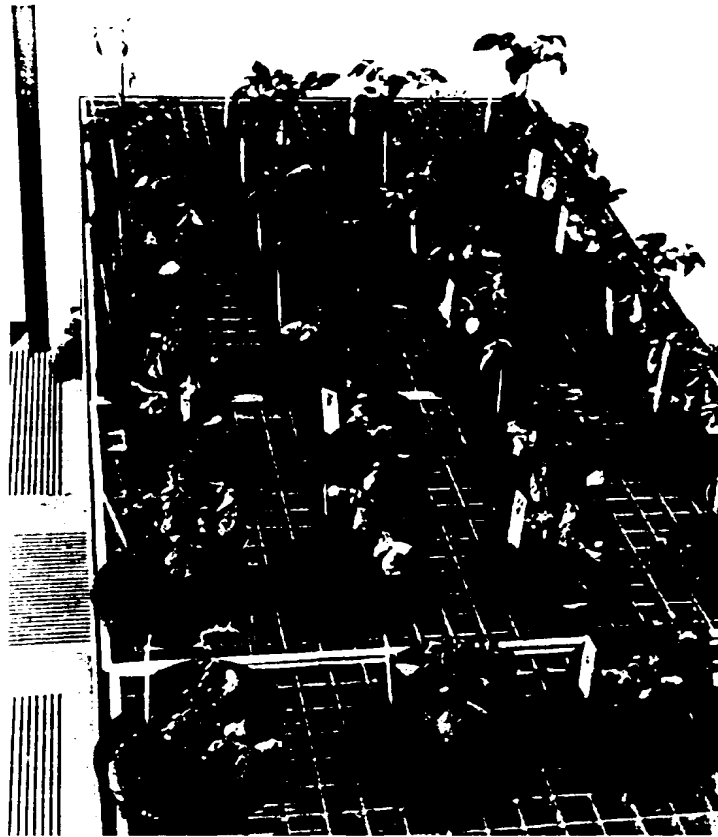


Fig. 3

A



B

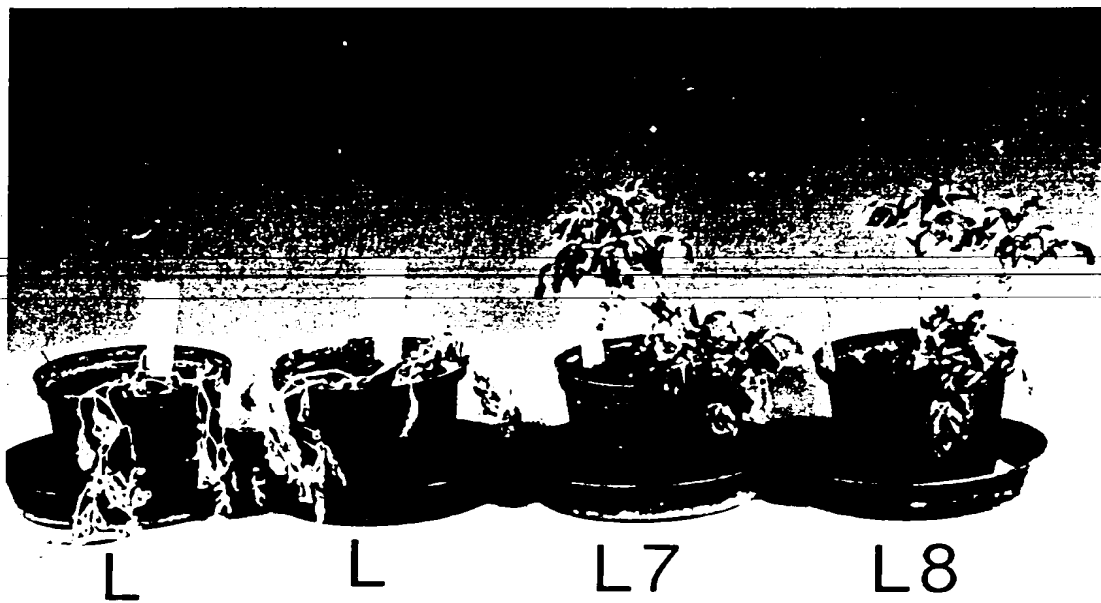
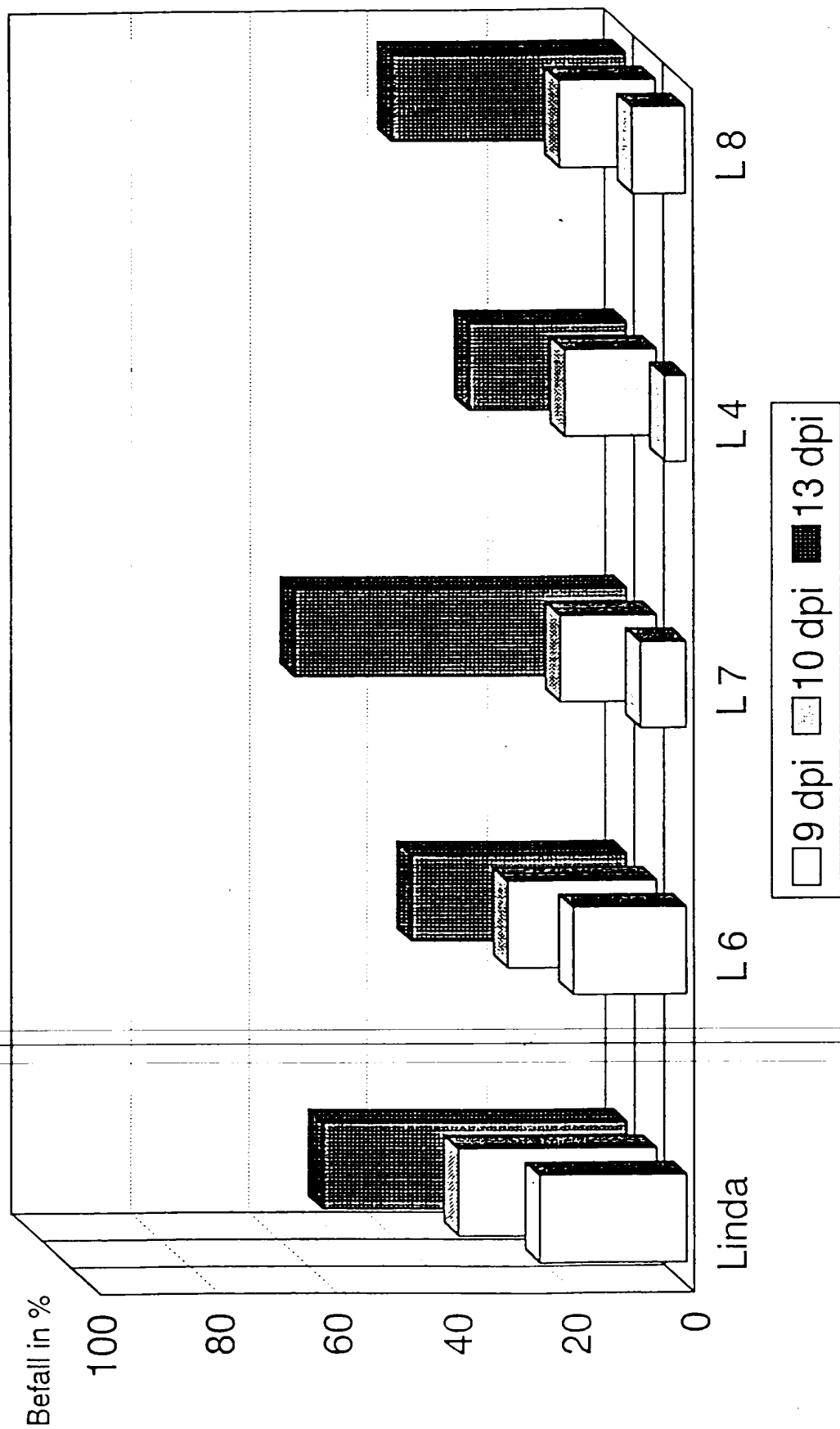


Fig. 4

Phytophthora infestans-Befall auf Linda u.a.

Labortest, R 1-11



US 0970034905P1



Creation date: 29-08-2003
Indexing Officer: MJOHNSON - MOZELLE JOHNSON
Team: OIPEBackFileIndexing
Dossier: 09700349

Legal Date: 06-06-2002

No.	Doccode	Number of pages
1	CTMS	4

Total number of pages: 4

Remarks:

Order of re-scan issued on